

# 微生物工程概论

刘如林 编著

南开大学出版社

# 微生物工程概论

刘如林 编著

南开大学出版社

## 内 容 提 要

本书从理论与实践相结合入手,以好气菌深层发酵为主线,较系统地论述了微生物工程的原理、方法、应用及进展。全书共25章,分上、下两篇,上篇为微生物反应过程,下篇为下游加工过程。主要内容有:生产菌种的选育,包括重组菌在内的各种发酵工艺及其动力学分析,微生物反应中的质能平衡与质量传递,发酵过程的检测、控制及计算机应用,灭菌工程。空气除菌与发酵设备,以及下游加工过程的单元操作与设备等。

本书内容丰富,取材较新,实用性强,并附图多幅,通俗易懂。可以作为高等院校工业发酵、生物化工、制药、食品、环保及微生物学等专业的教材或教学参考书,也可供从事相关专业科研和生产的科技人员参考。

## 微生物工程概论

刘如林 编著

---

南开大学出版社出版

(天津八里台南开大学校内)

邮编300071 电话3508542

新华书店天津发行所发行

河北省邮电印刷厂印刷

---

1995年10月第1版

1995年10月第1次印刷

开本: 850×1168 1/16

印张: 30 插页: 2

字数: 768千

印数: 1-1 000

ISBN 7-310-00794-8

---

Q·24 定价: 29.00元

# 前言

生物技术，随着基因重组等一系列新技术的问世，一举改变了它传统而古老的面貌跃居于新技术行列。由于生物技术的异军突起，把人类从当今面临的能源、食品、资源与环境等重大问题中解放出来，为世界展现出一幅美妙的前景。可以预料，当现代生物技术的潜力得以充分发挥时，必将引起一次新的产业革命。

微生物工程（亦称发酵工程）是生物技术的重要组成部分和基础，是渗透有工程学的微生物学。其核心是利用微生物（包括重组菌）的特定性状，通过现代化工程技术生产有用物质或直接应用于工业化生产的技术体系；是将传统发酵与DNA重组、细胞融合、分子修饰和改造等新技术结合并发展起来的现代发酵技术。实践证明，微生物工程不但是开发生物资源的关键技术，而且也是生物技术产业化的重要环节。此领域涉及面广、进展较快，本书限于篇幅，仅择其中精华，结合多年教学实践编写成册，并以《微生物工程概论》命名。希望读者能从中得到启示，不断追踪前沿工作，为发展新兴的微生物工业作出贡献。

目前国内外虽已出版了不少有关著作，但适合作为教科书者并不多。本书在编写过程中力求作到深入浅出，理论联系实际，以适应更多读者阅读，为教学、科研和生产服务。全书共25章，分为上、下两篇，上篇为微生物反应过程，下篇为下游加工过程。编写时兼顾了原理、技术与新进展等内容，注重实用，从工业角度描述微生物工程的特点，并附有必要的图表。本书可作为高等院校发酵、制药、食品、环保、生物化工及微生物学等专业的教材或教学参考书，也可供从事相关专业科研和生产的技术人员参考。

本书在编写过程中承蒙周与良先生的关怀和指导，李维等同志绘制了全部附图，谨此一并致以谢意。限于水平和时间，缺点和错误之处在所难免，敬希读者批评指正。

编著者

1995年5月于南开园

# 目 录

## 上篇 微生物反应过程

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| <b>第一章 绪论</b> .....         | ( 1 )  |
| 第一节 基本概念.....               | ( 1 )  |
| 第二节 微生物反应过程的特点.....         | ( 2 )  |
| 第三节 微生物工程的内容与发展.....        | ( 4 )  |
| 第四节 微生物工程的任务和方向.....        | ( 5 )  |
| <b>第二章 工业上常用的微生物</b> .....  | ( 7 )  |
| 第一节 细菌.....                 | ( 7 )  |
| 第二节 放线菌.....                | ( 9 )  |
| 第三节 酵母菌.....                | ( 11 ) |
| 第四节 霉菌.....                 | ( 13 ) |
| <b>第三章 生产菌种的选育</b> .....    | ( 17 ) |
| 第一节 菌种的分离与筛选.....           | ( 17 ) |
| 第二节 自然选育.....               | ( 21 ) |
| 第三节 诱变育种.....               | ( 22 ) |
| 第四节 基因重组育种.....             | ( 27 ) |
| 第五节 菌种的保藏.....              | ( 35 ) |
| <b>第四章 代谢产物的过量生产</b> .....  | ( 41 ) |
| 第一节 微生物的代谢调控.....           | ( 41 ) |
| 第二节 提高初级代谢产物产量的方法.....      | ( 46 ) |
| 第三节 提高次级代谢产物产量的方法.....      | ( 51 ) |
| 第四节 高浓度微生物的培养.....          | ( 53 ) |
| 第五节 提高高产菌种的稳定性.....         | ( 56 ) |
| 第六节 改进发酵产品的品质.....          | ( 56 ) |
| <b>第五章 微生物反应的质能平衡</b> ..... | ( 58 ) |
| 第一节 微生物反应的化学计量.....         | ( 58 ) |
| 第二节 得率因数.....               | ( 60 ) |
| 第三节 微生物反应的质能平衡.....         | ( 66 ) |
| <b>第六章 微生物发酵过程</b> .....    | ( 73 ) |
| 第一节 微生物发酵的类型.....           | ( 73 ) |
| 第二节 种子扩大培养.....             | ( 82 ) |
| 第三节 发酵培养基.....              | ( 88 ) |
| 第四节 发酵过程的中间分析.....          | ( 93 ) |
| <b>第七章 发酵动力学</b> .....      | ( 96 ) |

|             |                    |         |
|-------------|--------------------|---------|
| 第一节         | 数学模型               | ( 96 )  |
| 第二节         | 微生物的生长速率           | ( 98 )  |
| 第三节         | 底物消耗速率             | ( 104 ) |
| 第四节         | 代谢产物生成速率           | ( 106 ) |
| 第五节         | 动力学参数的确定           | ( 110 ) |
| 第六节         | 发酵过程模拟与计算机在线优化控制   | ( 111 ) |
| <b>第八章</b>  | <b>分批发酵和补料分批技术</b> | ( 113 ) |
| 第一节         | 分批发酵               | ( 113 ) |
| 第二节         | 补料分批技术             | ( 120 ) |
| <b>第九章</b>  | <b>连续发酵</b>        | ( 126 ) |
| 第一节         | 罐式连续发酵             | ( 127 ) |
| 第二节         | 管式连续发酵             | ( 132 ) |
| 第三节         | 连续发酵的实际应用          | ( 134 ) |
| <b>第十章</b>  | <b>发酵工艺控制</b>      | ( 140 ) |
| 第一节         | 温度对发酵的影响及其控制       | ( 140 ) |
| 第二节         | pH值对发酵的影响及其控制      | ( 144 ) |
| 第三节         | 溶解氧对发酵的影响及其控制      | ( 149 ) |
| 第四节         | 基质浓度对发酵的影响及补料控制    | ( 154 ) |
| 第五节         | 泡沫的控制              | ( 157 ) |
| 第六节         | 杂菌与噬菌体的防治          | ( 161 ) |
| <b>第十一章</b> | <b>基因重组菌的培养</b>    | ( 166 ) |
| 第一节         | 重组DNA实验准则          | ( 166 ) |
| 第二节         | 基因重组菌的培养特点及控制      | ( 167 ) |
| 第三节         | 基因重组菌分批培养动力学       | ( 174 ) |
| 第四节         | 培养装置与产物的提取         | ( 178 ) |
| <b>第十二章</b> | <b>气液质量传递</b>      | ( 183 ) |
| 第一节         | 氧的溶解和微生物的耗氧        | ( 184 ) |
| 第二节         | 培养液中氧的传递           | ( 186 ) |
| 第三节         | 影响供氧的因素            | ( 191 ) |
| 第四节         | 溶解氧、摄氧率及溶氧系数的测定    | ( 199 ) |
| <b>第十三章</b> | <b>灭菌工程</b>        | ( 203 ) |
| 第一节         | 湿热灭菌原理             | ( 203 ) |
| 第二节         | 分批灭菌的设备与计算         | ( 209 ) |
| 第三节         | 连续灭菌的设备与计算         | ( 212 ) |
| <b>第十四章</b> | <b>空气除菌</b>        | ( 218 ) |
| 第一节         | 空气除菌的方法            | ( 218 ) |
| 第二节         | 过滤除菌的流程与设备         | ( 227 ) |
| <b>第十五章</b> | <b>发酵设备</b>        | ( 233 ) |
| 第一节         | 概述                 | ( 233 ) |
| 第二节         | 厌氧发酵设备             | ( 235 ) |

|             |                     |         |
|-------------|---------------------|---------|
| 第三节         | 通风发酵设备              | ( 238 ) |
| 第四节         | 机械搅拌与搅拌功率           | ( 250 ) |
| 第五节         | 发酵罐的放大              | ( 258 ) |
| <b>第十六章</b> | <b>发酵过程的检测与自动控制</b> | ( 266 ) |
| 第一节         | 发酵工艺参数及其检测          | ( 266 ) |
| 第二节         | 发酵过程的自动控制           | ( 277 ) |
| 第三节         | 电子计算机在发酵过程中的应用      | ( 279 ) |

## 下篇 下游加工过程

|              |                     |         |
|--------------|---------------------|---------|
| <b>第十七章</b>  | <b>下游加工概述</b>       | ( 283 ) |
| 第一节          | 下游加工的一般流程及单元操作      | ( 283 ) |
| 第二节          | 下游加工方法的选择           | ( 289 ) |
| 第三节          | 下游加工的发展趋向           | ( 291 ) |
| <b>第十八章</b>  | <b>发酵液的预处理和固液分离</b> | ( 294 ) |
| 第一节          | 发酵液的预处理             | ( 294 ) |
| 第二节          | 发酵液的过滤              | ( 297 ) |
| 第三节          | 微生物细胞的破碎及其碎片分离      | ( 305 ) |
| 第四节          | 离心分离                | ( 309 ) |
| <b>第十九章</b>  | <b>吸附与沉淀</b>        | ( 313 ) |
| 第一节          | 吸附                  | ( 313 ) |
| 第二节          | 沉淀                  | ( 321 ) |
| <b>第二十章</b>  | <b>萃取</b>           | ( 329 ) |
| 第一节          | 溶剂萃取                | ( 329 ) |
| 第二节          | 双水相萃取               | ( 338 ) |
| 第三节          | 萃取设备                | ( 346 ) |
| <b>第二十一章</b> | <b>离子交换和电渗析</b>     | ( 353 ) |
| 第一节          | 离子交换                | ( 353 ) |
| 第二节          | 电渗析                 | ( 368 ) |
| <b>第二十二章</b> | <b>膜分离</b>          | ( 376 ) |
| 第一节          | 分类和定义               | ( 376 ) |
| 第二节          | 基本原理                | ( 378 ) |
| 第三节          | 膜的构成和性质             | ( 380 ) |
| 第四节          | 膜装置                 | ( 388 ) |
| 第五节          | 膜技术的应用              | ( 393 ) |
| <b>第二十三章</b> | <b>色层分离</b>         | ( 395 ) |
| 第一节          | 基本概念                | ( 395 ) |
| 第二节          | 柱色层分离法的装置和操作        | ( 398 ) |
| 第三节          | 常用的色层分离方法           | ( 403 ) |
| <b>第二十四章</b> | <b>蒸馏、蒸发和结晶</b>     | ( 418 ) |
| 第一节          | 蒸馏                  | ( 418 ) |

|                      |         |
|----------------------|---------|
| 第二节 蒸发.....          | ( 428 ) |
| 第三节 结晶.....          | ( 438 ) |
| 第二十五章 干燥.....        | ( 450 ) |
| 第一节 概述.....          | ( 450 ) |
| 第二节 气流干燥.....        | ( 453 ) |
| 第三节 喷雾干燥.....        | ( 456 ) |
| 第四节 沸腾干燥和沸腾造粒干燥..... | ( 462 ) |
| 第五节 振动干燥.....        | ( 465 ) |
| 第六节 真空干燥和冷冻干燥.....   | ( 466 ) |
| 主要参考文献.....          | ( 470 ) |



# 上篇 微生物反应过程

## 第一章 绪 论

生物技术是一门迅速发展中的边缘学科。它吸收并综合了近代生物学、生物化学、分子生物学、分子遗传学和化学工程等领域的最新成就，操纵生物的基因、细胞、组织和系统，以造福人类为目标，为人类展现出一幅过去所梦想不到的美妙前景。

微生物工程是生物技术的重要组成和基础，是生物技术产业化的重要环节。它将微生物学、生物化学和化学工程学的基本原理有机地结合起来，广泛而深刻地揭示了发酵过程的本质。它的形成与发展对于生物特别是微生物的产业化有着非常重要的意义。微生物工程的生命力在于在促进产业化发展的基础上不断实行技术改造、更新、创新，使其向高度人工控制和自动化的发酵生产转移，向高效合成代谢的发酵生产转移，在较短时间内获取更多高质量的产品，以满足社会更大的需求。因此，微生物工程既为人类创造更多的物质财富，又在生产实践中不断地得到丰富和发展。可以预料，随着科学技术的进步，微生物工程定会迅速发展，影响到工、农、医和科技等众多领域，为人类带来巨大效益。

### 第一节 基本概念

微生物工业是利用微生物的生长和代谢活动生产各种有用物质的现代工业，由于它以培养微生物（发酵）为主，所以习惯上也称为发酵工业。微生物工程是研究微生物工业生产中各单元操作的工艺和设备的一门学科，在工业生产上占有相当重要的地位。

微生物工程是利用微生物的特定性状和功能，通过现代化工程技术生产有用物质或直接应用于工业化生产的技术体系；是将传统发酵与现代的DNA重组、细胞融合、分子修饰和改造等新技术结合并发展起来的现代发酵技术。也可以说是渗透有工程学的微生物学，是发酵技术工程化的发展。作为现代科学概念的微生物发酵工业，是在20世纪40年代随着抗生素工业的兴起而得到迅速发展的。在现代微生物学、生物化学和遗传学等基础理论的推动下，逐步形成了一个大有发展前途的新兴工业部门，如抗生素、氨基酸、有机酸、酶制剂等工业的迅速崛起，在国民经济的众多领域中发挥了巨大作用。随着科学技术的发展，“发酵”作为一门工程学科的定义不断得到发展和充实。目前，人们把利用微生物在有氧或无氧条件下的生命活动来制备微生物菌体或其代谢产物的过程统称为发酵。而生物化学上关于发酵的定义

是“微生物在无氧时的代谢进程”。因此，微生物工程中的“发酵”已远远超出了生化范畴内关于发酵的定义。

微生物工程基本上可分为发酵和提取两大部分。发酵部分是微生物反应过程，提取部分也称后处理或下游加工过程。虽然微生物工业生产以发酵为主，发酵的好坏是整个生产的关键，但后处理在发酵生产中也占有很重要的地位。往往有这样的情况：发酵产率很高，但因后处理操作和设备选用不当而大大降低了总得率，所以发酵过程的完成并不等于工作的结束。完整的微生物工程应该包括从投入原料到获得最终产品的整个过程。微生物工程就是要研究和解决这整个过程中的工艺和设备问题，将实验室和中试成果迅速扩大到工业化生产中去。

实践证明，微生物工程不仅是开发微生物资源的一项关键技术，同时也是生物技术产业化的重要环节。目前，美国约有750家生物技术公司，实际从事生物技术工作的公司已超过1000家，开发的产品如工程药品和疫苗等有100多种，其产品销售额在1990年为10亿美元，1991年增至40亿美元，预计2000年将达到500亿美元。美国遗传技术公司自1985年销售第一个创收产品——“工程人生长激素”以来，已有人干扰素、乙肝疫苗、心活素(tPA)、红细胞生成素(EPO)、OKT3单抗、血凝因子、GM-CSF、G-CSF等投放市场。我国的“工程产品”已有乙肝表面抗原疫苗、人干扰素、青霉素酰化酶、幼畜腹泻K88-K99双价疫苗等投产或应用。这些产品都需通过发酵工程来完成，这些研究成果所产生的巨大效益必须通过生物技术产业化来实现。在实施生产过程中，还须经常考虑以下三点：(1)选择高效和性能稳定的优良菌株，包括“工程菌”，这是前提条件；(2)控制发酵过程中的各项条件，使之最适化、最佳化，这是发酵正常运转的保证；(3)整个发酵过程包括后处理工序各个环节必须配套，才有可能获取所需要的产品。这三方面相互依存，缺一不可。

## 第二节 微生物反应过程的特点

微生物反应过程是指由生长繁殖的微生物所引起的生物反应过程。这些过程既有利用微生物获得某种产物的过程，又有利用微生物消除某些物质(废水、废物的处理)的过程，但它们都是活微生物的反应过程。因此，这一过程中的产物可以是过程的中间或终点时的代谢产物，也可以是有机物的降解物或微生物自身的细胞。

微生物工程与化学工程非常接近，化学工程中许多单元操作在微生物工业中得到应用。国外许多学术机构把微生物工程作为化学工程的一个分支，称为“生化工程”。但由于微生物工业是培养和处理活的有机体，所以除了与化学工程有共性外还有它的特殊性。例如：空气除菌系统、培养基灭菌系统等都是微生物工业中所特有的。再如化学工程中，气液两相混合、吸收的设备，仅有通风和搅拌的作用，而通风机械搅拌发酵罐除了上述作用外，还包括复杂的氧化、还原、转化、水解、生物合成以及细胞的生长和分裂等作用，而且还有其严格的无菌要求，不能简单地与气体吸收设备完全等同起来。提取部分的单元操作虽然与化工中的单元操作无明显区别，但为适应菌体与微生物产物的特点，还要采取一些特殊措施并选用合适的设备。简言之，微生物工程就是化学工程中各有关单元操作结合了微生物特点的一门学科。

与化学工程相比，微生物反应过程具有以下特点：

(1) 作为生物化学反应, 通常在常温常压下进行, 因此没有爆炸之类的危险, 各种设备都不必考虑防爆问题, 还有可能使一种设备具有多种用途。

(2) 原料通常以糖蜜、淀粉等碳水化合物为主, 加入少量的各种有机或无机氮源, 只要不含毒物, 一般无精制的必要, 微生物本身能有选择地摄取所需物质。

(3) 反应以生命体的自动调节方式进行, 因此数十个反应过程能够像单一反应一样, 在称为发酵罐的单一设备内很容易地进行。

(4) 能够容易地生产复杂的高分子化合物。酶类的生产和光学活性体的有选择性生产等, 是发酵工业最有特色的领域。

(5) 由于生命体特有的反应机制, 能高度选择性地对复杂化合物在特定部位的氧化、还原、官能团导入等反应。

(6) 生产发酵产物的微生物菌体本身也是发酵产物, 富含维生素、蛋白质、酶等有用物质。因此, 除特殊情况外, 发酵液等一般对生物体无害。

(7) 发酵生产在操作上最需要的是防止杂菌污染。进行设备的冲洗、灭菌、空气过滤等, 使全过程在无菌状态下运转, 是非常重要的。一旦失败, 就要遭受重大损失。特别是噬菌体对发酵的危害更大。

(8) 通过微生物的菌种改良, 能够利用原有生产设备使生产飞跃上升。

发酵过程的这些特征决定了发酵工程的种种优点, 使得发酵工程成为生物技术的核心之一而受到广泛重视。但发酵过程中尚有一些问题应该引起注意, 例如:

(1) 底物不可能完全转化成目的产物, 副产物的产生不可避免, 因而造成提取和精制困难, 这是目前发酵行业下游操作落后的原因之一。

(2) 微生物反应是活细胞的反应, 产物的获得除受环境因素影响外, 也受细胞内因素的影响, 并且菌体易发生变异, 实际控制相当困难。

(3) 原料是农副产品, 虽然价廉, 但质量和价格波动较大。

(4) 生产前准备工作量大, 花费高。相对化学反应而言, 反应器效率低。

(5) 与化工相比, 虽然设备简单, 能耗也低, 但因过高的底物或产物浓度常导致酶的抑制或细胞不能耐受过高的渗透压而失活。因此, 底物浓度不能过高, 从而导致使用大体积的反应器, 并且要在无杂菌污染情况下进行操作。

(6) 发酵废水常具有较高的COD和BOD, 需要进行处理。

虽然开发应用固定化等生物技术有利于改变上述不利现象, 但在短时间内这种局面不会有很大变化。因此, 需不断努力革新, 开创新的工艺与设备。

具有以上特征的发酵工业, 历来以微生物的改良和新产品的研制这种纯生物学研究为研究的主题, 而探求工业生产设备改进的生化工程学却有被忽视的倾向。酒精等厌氧发酵产品, 影响收率高低的主要因素是菌种的特性和设备无菌度的保持, 因而对生化工程的要求较少。但二战后随着青霉素发酵技术的引进, 以氧溶解于培养液的速度和搅拌功率的经济性为中心, 强烈要求工程学者们协同努力。

### 第三节 微生物工程的内容与发展

微生物工程的内容是随着科学技术的发展而不断扩大和充实的。其主要内容包括生产菌种的选育、发酵条件的优化与控制、反应器的设计及产物的分离、提取与精制等过程。

微生物工程就其发酵方式而言可分为厌氧发酵和通风发酵两大类。厌氧发酵包括酒类发酵、酒精发酵、丙酮丁醇发酵、乳酸发酵和甲烷发酵等。通风发酵的主要代表有酵母培养、抗生素发酵、有机酸发酵、酶制剂生产和氨基酸发酵等。

微生物工程涉及的生产部门有食品工业、农产品加工、酒精和饮料酒工业、氨基酸工业、有机酸工业、化学工业、医药工业、单细胞蛋白的生产、工农业下脚料的处理和增值、工业废水的处理和增值、生物气的生产(如沼气等)、矿石的处理(选矿)等。

每一种发酵至少同一种微生物相联系。发酵中常用的微生物主要有细菌、放线菌、酵母菌和霉菌。微生物的生物学性状和发酵条件决定了它们相应产物的生成。目前已知具有生产价值的发酵产物类型有:微生物菌体的本身;由菌体或酶系实现生物转化所得到的产物;由菌体合成的大分子化合物;菌体生长所必需的基本代谢产物;菌体生长不必需的次生代谢产物等。

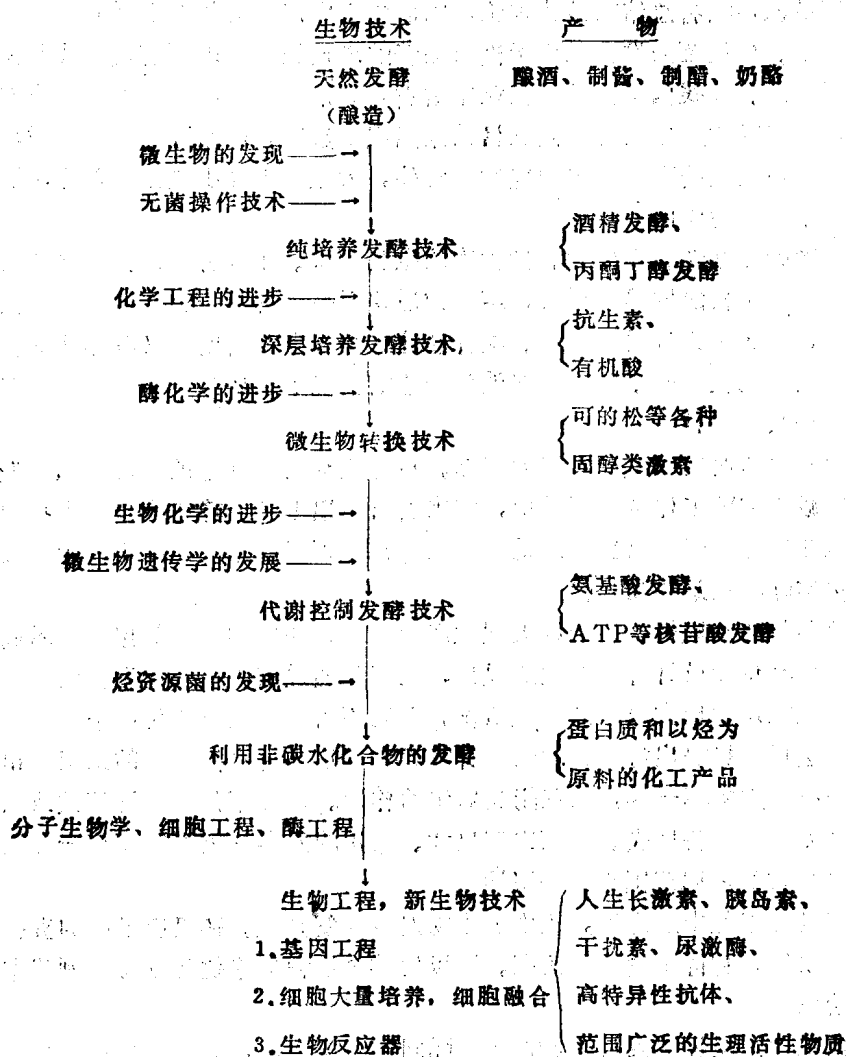
微生物工程的产品可归纳成三大类:

- (1)细胞的生产,如酵母、细菌、霉菌和真菌(包括食用菌)的生产。
- (2)酶类的生产,如各个酶种、酶制剂和各种曲类(小曲、大曲、麸曲、麦曲)等。
- (3)代谢产物,如工业溶剂(酒精、丙酮丁醇等),有机酸(醋酸、乳酸、柠檬酸、反丁烯二酸、衣康酸等),氨基酸(谷氨酸、赖氨酸、丙氨酸等),维生素(B族维生素、维生素C等),抗生素(青霉素、链霉素等),多糖类(葡聚糖、细菌多糖和真菌多糖等),核苷及核苷酸(ATP、AMP、5'-肌苷酸、肌苷等),最近各种激素、胰岛素、干扰素、抗体、疫苗等也可用发酵方法生产。

微生物工程涉及的面是随着发酵技术的进步而扩大的,在微生物的作用被发现之前,人们主要是从事酿酒、制酱、制奶酪等生产,采用的是天然发酵技术;当纯培养技术发明以后,开始用纯培养方法进行酒精和溶剂发酵。酿造等传统发酵工业是和各国的风土相适应而长年累月慢慢发展起来的。此领域对于技术的进步有顽固拒绝的倾向,还由于自古以来长期积累的工艺相当成熟,因而各国都不会从根本上进行改造。当然,啤酒、威士忌酒等在二战后大量生产是伴随着合理的生产技术而发展的。

第二次世界大战后期随着化学工程的进步,创立了深层通风发酵技术,使抗生素、有机酸、酶制剂等发酵得到发展;随着酶化学的进步产生了微生物转化技术,人们利用微生物或酶来代替化学合成方法,生产可的松等各种固醇类激素;本世纪50年代,生物化学和微生物遗传学的发展导致代谢控制发酵技术的应用,使得氨基酸、核苷酸发酵得以商业化;在发现某些微生物能以烃类作为碳源的基础上发展了利用非碳水化合物发酵技术,用来生产SCP和其它化工产品;近年来,随着分子生物学、细胞工程、酶工程的进展,生物工程和新的生物技术(如基因工程、细胞大量培养、细胞融合、生化反应器等)得到了发展,一大批新的产品,如人生长激素、胰岛素、干扰素、尿激酶、抗体、疫苗等都可以用发酵方法来生产(参见表1-1)。

表1-1 从发酵看生物技术的进步



由上述可见, 微生物工程的潜力几乎是无穷的, 随着科学技术的发展, 它涉及的范围将愈来愈宽广。

#### 第四节 微生物工程的任务和方向

发酵过程不仅需要微生物具有优良的高产性状, 而且还必须提供微生物菌种所需的各种最适环境条件。控制好最适合的生长条件, 就为菌种优良性状的基因表达提供了先决条件。在发酵工业生产中, 微生物生长繁殖的场所是发酵用的各类反应器。发酵控制实质上就是在发酵过程中对其物理和化学参数进行罐内的直接测定与控制。目前对直接测量发酵过程中的底物、菌体浓度、细胞内组分、气液界面和发酵液粘度等还缺乏快速而简易的检测手段, 有一些新的方法也正在研究开发中。

近年来, 由大量生产实践和科学实验总结出来的发酵机制、发酵动力学、连续发酵的

理论研究,促进了微生物工业生产中许多实际问题的解决。但由于微生物工业飞跃发展,目前的经验还不足或还没有总结归纳为理论,因而生产中出现的某些实际问题尚无完善的理论指导,例如霉菌、放线菌的发酵就由于没有完善的理论指导,因而还没有比较满意的设计和放大方法。而霉菌、放线菌又是发酵工业中占有重要地位的菌类。又如连续发酵的理论虽然研究得很多,但实际生产中的许多问题目前未能很好解决,因而除了酒精、啤酒、丙酮、丁醇等生产和活性污泥法处理废水采用连续发酵外,大生产上极少应用。理论问题之所以难以解决,不外乎下列两种原因:

(1)微生物的复杂性和多样性。微生物的生长要求、生理特点、代谢途径各不相同,因此,适合于某种微生物的发酵罐形式,不一定适用于另一种微生物;同一种形式的发酵罐适用于某些菌种,但各种菌种对通风量、搅拌转速、培养条件等要求又各不相同。因此,发酵生产条件的变化比化工生产复杂。要在消耗最小的情况下维持最高生产率,目前只有通过大量试验才能获得最佳条件。

发酵动力学对阐明发酵机制有很大帮助,也是连续发酵理论的基础。随着发酵动力学研究的进展,给减少试验工作带来了希望,将来有可能用电子计算机模拟微生物的生长条件来代替一部分试验工作,但是目前发酵动力学只有部分可以应用在实际生产中,大部分尚处于初级阶段,离实际使用距离尚远。

(2)试验条件的局限性。目前因大型生产设备条件的限制,不能用各种不同的条件进行试验,所以某些理论和设计计算方法的提出,大多是通过实验室小试后得到的。小型试验虽然在一定程度上能反映出大设备的一些情况,但它不可能包括全部生产条件,如计算发酵罐中溶解氧的方法目前已提出好几种理论和计算式,用这些计算式计算的结果得出的数据各不相同,与实测数据大多不一致,或仅能起对比的作用。这并不是这些计算式或试验不准确,而是试验条件(包括设备型式、几何比例尺寸、采用的发酵液类型等)有一定的局限性,因而导致这些公式的适用范围也有局限性。

计算机在发酵工程中的应用,也由于生物对象的复杂性,还没有足够的直接测量传感器和完善的数学模型,有待于进一步研究。所以发酵全过程的最优化动态控制基本上还处于检验与半检验阶段。

总之,微生物工程领域内很多理论和实际问题远未解决,有待今后进一步研究和探讨。在目前阶段,要很好解决生产问题,必须多做试验。实验室小型试验、中间试验、大型生产这个过程是目前新产品投产的必经之路。

## 第二章 工业上常用的微生物

自然界中存在着各种各样的微生物，它们具有不同的形态结构和生理特征，可以分成不同的类群。其中，细菌、放线菌、酵母和霉菌等已广泛应用于发酵工业，有的直接利用其菌体细胞，有的则利用其代谢产物或转化机能。了解微生物的种类、形态及生理特征的目的在于认识微生物的特性，掌握其生命活动规律，使其在工业生产中充分发挥作用。

微生物具有体积小、种类多、分布广、繁殖快、便于培养和容易发生变异等特点，并且在生产中不易受时间、季节、地区的限制，所以在工业生产上越来越广泛地被重视和应用。如前所述，微生物工程是以微生物的生命活动为中心的，各种发酵生产都必须有相应的微生物。微生物的生物学性状和发酵条件决定了其相应产物的生成。

工业上用的全部微生物都称为工业微生物。此外还要和杂菌污染打交道，杂菌污染会严重影响甚至完全破坏我们所需的工业发酵过程。此外，有些微生物既是工业生产菌，又可能是杂菌。例如，醋酸菌在生产醋时是生产菌，但会引起酒类的败坏。工业生产上常用的微生物和经常遇到的杂菌主要是细菌、放线菌、酵母菌和霉菌。由于发酵工程本身的发展以及遗传工程正在进入发酵过程，病毒、藻类等其它微生物也正在逐步地变为工业生产菌。本章主要介绍与发酵工程有关的主要微生物类群。

### 第一节 细菌

细菌是自然界中分布最广、数量最多的一类微生物，属单细胞原核生物，具有较典型的核分裂或二分分裂繁殖。体形微小，通常在1000倍的光学显微镜或电子显微镜下才能看到。工业生产常用的细菌有以下几种：

#### 1. 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)

枯草芽孢杆菌为生芽孢的需氧菌。营养细胞杆状，大小一般为 $0.7 \sim 0.8 \times 2 \sim 3 \mu\text{m}$ 。菌端半圆形。单个或呈短链。在细胞中央部位形成芽孢，芽孢为椭圆形，大小约为 $0.6 \sim 0.7 \times 1.0 \sim 1.5 \mu\text{m}$ 。芽孢萌发，沿赤道分裂，为中腰发芽。细胞侧生鞭毛，能运动。革兰氏染色阳性。生长温度为 $30 \sim 39^\circ\text{C}$ ，但在 $50 \sim 56^\circ\text{C}$ 时尚能生长。最适pH为 $6.7 \sim 7.2$ 。属需氧菌。芽孢耐高温，一般在 $100^\circ\text{C}$  3h才能杀死。有的芽孢抗高温能力更强，在 $100^\circ\text{C}$ 煮沸8h尚能发育生长，故需高温灭菌才行。它能在铵盐液体中发酵各种糖类生成酸。

由于芽孢能耐高温，所以分布较广，常存于枯草和土壤中。一般来说为腐败菌，如在酱油、酱类和白酒制曲时，如果水分含量大，温度较高，就容易造成枯草杆菌迅速繁殖。这不但消耗原料蛋白质和淀粉，而且生成刺眼鼻的氨味，造成曲子发粘和异臭，使制曲失败。经科研获得的枯草杆菌能产生大量的淀粉酶和蛋白酶，这些已分离到的优良菌种在工业生产上得到了广泛应用。例如，AS1.393枯草芽孢杆菌用于生产中性蛋白酶。发酵生产酱油、食醋。

及饴糖时就可采用BF7658枯草芽孢杆菌生产的 $\alpha$ -淀粉酶。

## 2. 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)

细胞杆状，长度为 $0.5 \times 1.0 \sim 3.0 \mu\text{m}$ ，有的近似球状，有的则为长杆状。革兰氏染色阴性。能运动或不运动，运动者周生鞭毛。许多小种产生荚膜或微荚膜，无芽孢。

大肠杆菌发酵葡萄糖和乳糖，产酸、产气。大肠杆菌的谷氨酸脱羧酶在工业上被用来进行谷氨酸定量分析。还可以利用大肠杆菌制取天冬氨酸、苏氨酸和缬氨酸等。在医药方面和基因工程方面，大肠杆菌是很好的研究材料。

## 3. 乳酸杆菌 (*Lactobacillus*)

细胞杆状到球状。常生长成链，大多不运动，能运动者为周生鞭毛。革兰氏染色阳性。无芽孢。正常菌落粗糙。发酵碳水化合物，产物的85%以上为乳酸。厌氧或兼性厌氧。生长温度为 $45 \sim 50^\circ\text{C}$ 。

常用的德氏乳酸杆菌为杆状，大小为 $0.5 \sim 0.8 \times 2 \sim 9 \mu\text{m}$ 。在麦芽汁糖化液内，繁殖特别旺盛。菌体肥壮，产酸力特别强。在固体培养基上，菌落微小。在肉汁培养基内略带混浊。

由于乳酸菌能产生乳酸，所以可用于食品的保存和调整食品的风味。在食品工业上如干酪的成熟、乳脂的酸化和腌菜、泡菜等制作无不与乳酸菌有关。在酱油酿造过程中，它也起到了良好的作用。

## 4. 丙酮丁醇梭菌 (*Clos. acetobutylicum*)

细胞呈杆状，圆端， $0.6 \sim 0.7 \times 2.6 \sim 4.7 \mu\text{m}$ ，芽孢囊 $1.3 \sim 1.6 \times 4.7 \sim 5.5 \mu\text{m}$ 。单生或成对，但成链。芽孢卵圆，中生或次端生，使芽孢囊膨大成梭状或鼓槌状。无荚膜。以周毛运动。有淀粉粒。革兰氏染色阳性，可能变为阴性。专性厌氧菌。在葡萄糖琼脂上形成圆形紧密隆起的菌落，乳脂色，不透明，液化明胶。能发酵多种糖类，包括淀粉、糊精等。生产上多用来生产丙酮丁醇。发酵适温 $30 \sim 32^\circ\text{C}$ ，生长适温 $37^\circ\text{C}$ ，最适pH $6.0 \sim 7.0$ 。

## 5. 肠膜状明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*)

细胞呈球状或双凸镜状，大小 $0.5 \sim 0.7 \times 0.7 \sim 1.2 \mu\text{m}$ ，成对或链，常排列成短链。革兰氏染色阳性，菌落小，灰白，隆起，不液化明胶。能同化多种糖产酸、产气。微需氧至兼性厌氧。生长需缬氨酸和谷氨酸。此菌在蔗糖液中形成特征性葡聚糖粘液。促使形成这一特征的温度是 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 。在厌氧条件下能分解葡萄糖。

此菌生长温度在 $10 \sim 37^\circ\text{C}$ 之间，适温为 $20 \sim 30^\circ\text{C}$ 。因其常使糖汁变粘而无法加工，故为糖厂之害菌。但它却是葡聚糖的生产菌。

## 6. 醋酸杆菌 (*Acetobacter*)

细胞从椭圆形到杆状， $0.6 \sim 0.8 \times 1.0 \sim 3.0 \mu\text{m}$ 。有单个的、成对的，也有成链的。在老培养物中易呈多种畸形菌体，如丝状、棒状、弯曲等。鞭毛有两种类型，一种是周生鞭毛，另一种是端生鞭毛。不形成芽孢。

醋酸菌是化能异养菌，革兰氏染色阴性。因为没有芽孢，故对热抵抗力较弱。根据醋酸菌发育时对温度的要求和特性，可将醋酸菌分为两类：一般发育适温在 $30^\circ\text{C}$ 以上，以氧化酒精成醋酸为主的称为醋酸杆菌；另一类发育适温在 $30^\circ\text{C}$ 以下，氧化葡萄糖为葡萄糖酸的称为葡萄糖氧化杆菌 (*Gluconobacter*)。在醋酸杆菌中常用的有AS1.41，外形为短杆状，两端钝圆，革兰氏染色阴性。对培养基要求粗放，在米曲汁培养基中生长良好。好气性。氧化酒精为醋酸，于空气中使酒精变浑浊。表面有薄膜，有醋酸味。也能氧化醋酸为 $\text{CO}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}$ 。



繁殖适宜温度为31°C, 发酵温度一般为36~37°C。

#### 7. 棒状杆菌 (*Corynebacterium*)

细胞呈杆状, 直形或微弯。常呈一端膨大的棒状, 折断分裂, 成“八”字形排列或栅状排列。不运动, 仅少数致病菌能运动。无芽孢。革兰氏染色阳性, 也有些阴性反应者。菌体内着色不均匀, 好氧或厌氧。

调味品生产中, 如谷氨酸生产常用的菌种有北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense*)。其细胞通常为短杆状至小棒状, 有时微呈弯曲, 两端钝圆, 不分枝。呈多形态, 即培养6h后细胞有延长现象。细胞排列为单个、成对或“八”字形。细胞大小为 $0.7\sim 0.9\times 1.0\sim 2.5\mu\text{m}$ 。在26~37°C培养时生长良好, 41°C时生长较弱。pH5~10均能生长, 最适pH为6~7.5。生物素是必需的生长因素, 硫胺素或某些氨基酸有促进生长的作用。能利用葡萄糖、果糖、甘露糖、麦芽糖等产酸, 但均不产气。通气培养在含葡萄糖和尿素或铵盐的适宜培养基中, 能大量积累L-谷氨酸。

#### 8. 短杆菌 (*Brevibacterium*)

细胞为短而不分枝的直杆状, 一般在 $0.5\sim 1.0\times 1.0\sim 5\mu\text{m}$ 左右。大多数不具鞭毛。在肉汁蛋白胨培养基上生长良好。有时产生非水溶性色素, 呈红、橙红、黄、褐色。革兰氏染色阳性。不形成芽孢。为好氧微生物。多数从葡萄糖发酵产酸, 不发酵乳糖。大多数液化明胶, 还原石蕊。

此属菌有谷氨酸发酵能力, 在利用糖质原料的谷氨酸发酵中, 需要生物素作为生长因子, 才能满足谷氨酸发酵。短杆菌属中的黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*) 和硫磺短杆菌 (*B. thiogenitalis*) 能用于谷氨酸发酵生产。

#### 9. 黄单胞菌 (*Xanthomonas*)

细胞直杆状, 两端钝圆稍尖, 大小为 $0.4\sim 0.7\times 1.2\sim 1.5\mu\text{m}$ 。革兰氏染色阴性, 无芽孢, 极生鞭毛。在含蔗糖的琼脂平板上可形成圆形、边缘整齐、粘稠光滑的黄色菌落, 液体培养形成黄色粘稠的胶状物——荚膜多糖, 其黄色为一种非水溶性色素。

野油菜黄单胞菌 (*X. campestris*) 在通气条件下, 于pH6.8~7.0、28~30°C时, 能以淀粉作碳源发酵生产黄原胶 (Xanthan gum)。

## 第二节 放 线 菌

放线菌因其菌落呈放射状而得名。它是一个原核生物类群, 在自然界中分布很广, 尤其在含有机质丰富的微碱性土壤中较多。大多腐生, 少数寄生。它的最大经济价值在于能产生多种抗生素。从微生物中发现的抗生素, 有60%以上是放线菌产生的, 因此人们在抗生素发酵工业中, 非常重视对放线菌的研究与运用。常用的放线菌有以下几种:

#### 1. 链霉菌属 (*Streptomyces*)

链霉菌的基内和气生菌丝多分枝, 无分隔, 直径 $0.5\sim 2\mu\text{m}$ 。气生菌丝产生许多孢子串生的孢子链, 孢子链长短不等。此属中不少菌种产生抗生素, 这些抗生素约占各种微生物 (包括放线菌) 所产抗生素的50%以上。

(1) 灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*) 在葡萄糖-硝酸盐培养基上生长时, 菌落平而薄, 初为白色, 逐渐变为橄榄色。气生菌丝浓密, 粉状, 呈水绿色。发育适温37°C。